

Pola Produksi Ajmalisin dari Kultur Agregat Sel *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. dalam Bioreaktor Airlift

Production Pattern of Ajmalicine in Catharanthus roseus (L.) G. Don. Cell Aggregates Culture in the Airlift Bioreactor

RIZKITA RACHMI ESYANTI*, AIDA MUSPIAH

Prodi Biologi, Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung, Jalan Ganesha 10, Bandung 40154

Diterima 11 Juli 2005/Disetujui 15 November 2006

A research has been conducted to optimize the rate of aeration and initial weight of cell aggregates in the production of ajmalicine in *Catharanthus roseus* cell culture in airlift bioreactor. *Catharanthus roseus* culture were grown in Zenk medium with the addition of 2.50×10^{-6} M naphthalene acetic acid (NAA) and 10^{-5} M benzyl amino purine (BAP). Cell aggregates were sub-cultured two times before transferring 20 and 30 g/fw of cell aggregates into bioreactor, respectively, and aerated with the rate of 0.25 l min^{-1} and 0.34 l min^{-1} , respectively. The pattern of ajmalicine production in bioreactor were observed in every three days within 24 days. Qualitative and quantitative analysis were conducted using HPLC connected to Cromatopac CL-7A Plus. The results showed that the cell aggregates and medium contain ajmalicine. The highest concentration was obtained in combination of 30 g/fw and 0.34 l min^{-1} aeration compare to 20 g/fw - 0.25 l min^{-1} , 20 g/fw - 0.34 l min^{-1} , as well as 30 g/fw - 0.25 l min^{-1} . The highest ajmalicine content in cell aggregates was obtained on the 12 days ($79.23 \mu\text{g g}^{-1}$) whilst in medium was obtained in the 18th days ($981.15 \mu\text{g l}^{-1}$).

Key words: ajmalicine, cell aggregates culture, *C. roseus*, airlift bioreactor

PENDAHULUAN

Ajmalisin merupakan senyawa yang termasuk dalam kelompok monoterpen indol alkaloid. Senyawa ini dihasilkan oleh tanaman tapak dara (*Catharanthus roseus*) yang berguna sebagai obat antihipertensi (Zenk *et al.* 1977). Kebutuhan akan senyawa tersebut terus meningkat setiap tahun. Oleh karena itu, senyawa ini potensial untuk diproduksi dalam jumlah banyak dan waktu yang singkat, karena diperlukan sekitar 3600 kg/ tahun (Verpoorte *et al.* 1993).

Kultur jaringan tumbuhan merupakan metode alternatif untuk menghasilkan metabolit sekunder. Hal ini karena metode ini mempunyai beberapa keuntungan, di antaranya dapat dihasilkan pada kondisi lingkungan yang terkontrol serta tidak bergantung pada iklim dan kondisi tanah, kultur bebas dari kontaminasi mikroba dan serangga, sel-sel dapat dengan mudah diperbanyak untuk memproduksi metabolit spesifik. Selain itu dengan metode ini serta dihasilkan metabolit sekunder yang mudah untuk dimurnikan (Vanisree *et al.* 2004).

Pada penelitian Ratnasari *et al.* (2001), peningkatan ajmalisin masih dilakukan dalam skala kecil, yaitu pada Erlenmeyer 125 ml. Oleh karena itu, untuk produksi ajmalisin yang lebih banyak diperlukan peningkatan skala dari Erlenmeyer ke bioreaktor. Bioreaktor memiliki banyak keuntungan untuk kultivasi sel tumbuhan, yaitu memberikan kontrol yang lebih baik untuk produksi senyawa bioaktif skala

besar pada kultur suspensi sel dan memungkinkan pengaturan kondisi secara konstan pada setiap fase. Selain itu, penanganan kultur seperti inokulasi atau pemanenan lebih mudah dan menghemat waktu, serta pemberian nutrisi dapat mempercepat laju multiplikasi dan kandungan bioaktifnya (Fulzele 1994). Shuler dan Kargi (1992) juga menyatakan bahwa kultur suspensi sel di dalam bioreaktor akan menghasilkan metabolit sekunder yang lebih banyak dan dalam waktu yang lebih singkat, bila dibandingkan dengan yang terjadi di alam. Sebagai contoh, tanaman *Lithospermum erythrorhizon* menghasilkan sikonin 1-2% berat kering (BK) setelah berumur lebih dari lima tahun, sedangkan dalam kultur sel dengan menggunakan bioreaktor mampu memproduksi sekitar 14% BK sikonin dalam waktu tiga minggu. Selain itu reaktor yang menggunakan pengangkutan agregat sel dengan udara akan menghasilkan biomassa sel dan produksi metabolit sekunder yang tinggi, karena tipe reaktor ini memberikan pola-pola pengadukan yang seragam dan cocok untuk kultur suspensi sel tanaman, sehingga sel tidak mengendap di dasar bioreaktor (Kargi & Rosenberg 1987).

Berdasarkan uraian di atas, maka dilakukan penelitian mengenai pola produksi ajmalisin dari kultur agregat sel *C. roseus* dalam bioreaktor tipe *airlift reactor*. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan kecepatan aerasi dan berat agregat awal yang optimum untuk memproduksi ajmalisin pada agregat sel *C. roseus* dalam bioreaktor, dan juga untuk mengetahui pola produksi ajmalisin pada agregat sel *C. roseus* dalam bioreaktor dengan sistem *fed-batch*.

*Penulis untuk korespondensi, Tel. +62-22-2509172 pes 3177, Fax. +62-22-2534107, E-mail: rizkita@sith.itb.ac.id

BAHANDANMETODE

Tanaman yang Digunakan sebagai Eksplan. Sumber eksplan adalah daun *C. roseus* yang berbunga merah muda, berumur 2.5-3 bulan. Eksplan disterilisasi permukaan dengan Na Hipoklorit 0.53% selama 20 menit.

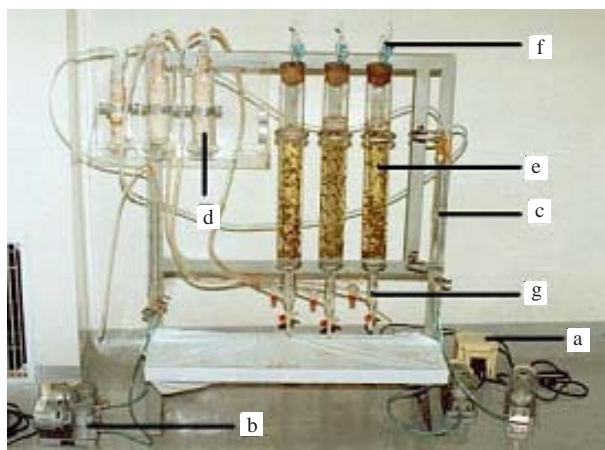
Induksi Kalus dan Agregat Sel. Eksplan daun ditanam pada medium padat Zenk dengan penambahan kombinasi zat pengatur tumbuh (zpt) 2.50×10^{-6} M *naphthalene acetic acid* (NAA) dan 10^{-5} M *benzyl amino purine* (BAP) (Fitriani *et al.* 1999). Kalus yang terbentuk setelah satu bulan selanjutnya disubkultur ke medium cair dengan konsentrasi zpt yang sama dengan medium padat. Kultur cair diagitasi dengan kecepatan 120 rpm dan diinkubasi pada suhu kamar dengan kondisi gelap (Ratnasari *et al.* 2001).

Optimasi Laju Aerasi, Berat Awal Agregat, dan Penentuan Pola Produksi Ajmalisin. Optimasi dilakukan dalam bioreaktor berukuran 1.50 l. (Gambar 1). Kultur agregat sel, masing-masing sebanyak 10, 20, 30, dan 40 g dimasukkan ke dalam bioreaktor dengan laju masing-masing 0.25, 0.34, dan 0.44 l menit⁻¹.

Penentuan Kurva Kandungan Ajmalisin. Kurva kandungan ajmalisin diperoleh dengan menghitung kandungan ajmalisin di dalam agregat dan medium setiap tiga hari sekali selama 24 hari. Agregat sel dan medium diekstraksi kemudian dianalisis dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT).

Ekstraksi Bahan. Agregat sel dikeringkan dengan *freeze dryer*. Bahan kering dan medium diekstraksi dengan metode Asada dan Shuler (1989). Bahan diekstrak dengan metanol kemudian dievaporasi. Residu diasamkan, kemudian diekstraksi dengan diklorometana. Setelah itu ditambahkan NaOH hingga pH 11 dan diekstraksi dengan diklorometana, kemudian diuapkan.

Analisis Kualitatif dan Kuantitatif dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Alat KCKT dihubungkan dengan kromatopak Shimadzu CR-7A plus. Fase gerak yang digunakan berupa larutan yang terdiri atas metanol: asetonitril: diamonium hidrogen fosfat 5 mM = 3:4:3 secara isokratik.



Gambar 1. Bioreaktor tipe *Airlift Reactors*. a. regulator voltase, b. aerator, c. rotameter, d. filter udara, e. kolom bioreaktor, f. tutup leher angsa, g. keran pengeluaran.

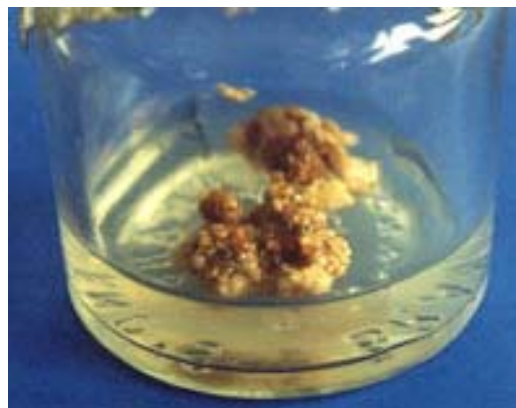
Kecepatan aliran diatur 1 ml menit⁻¹. Jenis kolom yang digunakan adalah shim-pack CLC-ODS C18 0.15 m diameter 0.60 mm. Panjang gelombang UV yang digunakan adalah 298 nm (Sim *et al.* 1994).

HASIL

Induksi Kalus dan Agregat Sel. Pada potongan daun *C. roseus* yang ditanam pada medium Zenk (Zenk *et al.* 1977) dengan penambahan kombinasi zpt NAA 2.50×10^{-6} M dan BAP 10^{-5} M terbentuk kalus kompak yang berwarna coklat (Gambar 2). Inisiasi kalus terlihat seminggu setelah penanaman (Fitriani *et al.* 1998; Ratnasari *et al.* 2001).

Kalus kompak yang dimasukkan ke dalam medium cair Zenk (Zenk *et al.* 1977) dengan kombinasi zpt yang sama dengan medium padat digolongkan sebagai kultur agregat (Gambar 3). Kultur ini memiliki ukuran diameter yang bervariasi dari 2-7 mm dan setelah dibuat preparat mengandung lebih dari 200 sel dengan komposisi sel yang homogen dan belum terdiferensiasi.

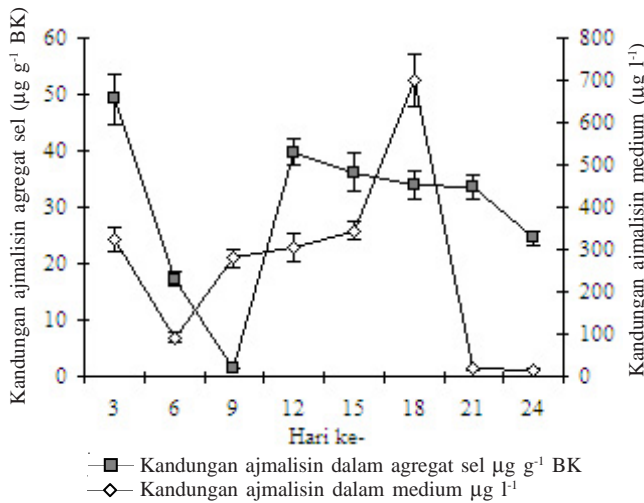
Optimasi Laju Aerasi, Berat Agregat Sel Awal, dan Penentuan Pola Produksi Ajmalisin. Hasil optimasi pendahuluan menunjukkan bahwa berat agregat sel awal 10 dan 40 g tidak dapat digunakan. Berat agregat yang dapat digunakan adalah 20 dan 30 g, dengan laju aerasi masing-



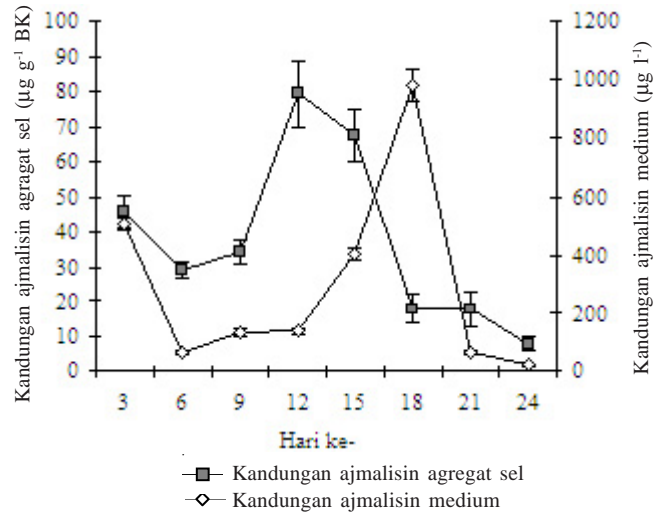
Gambar 2. Kalus kompak *C. roseus* dalam medium padat.



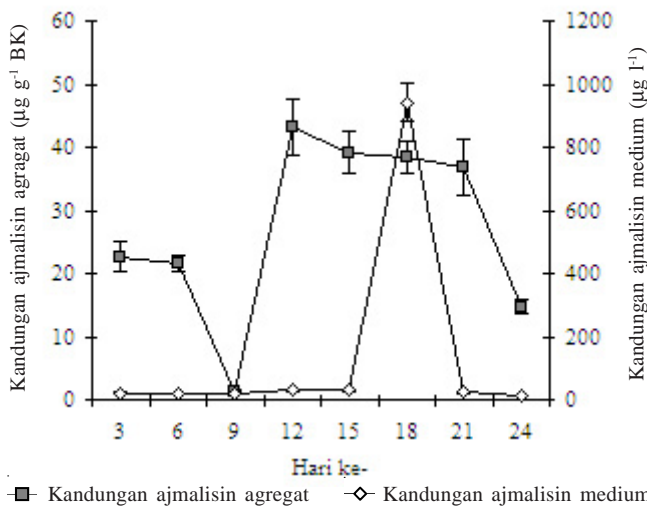
Gambar 3. Kultur agregat sel *C. roseus* dalam medium cair Zenk berumur empat minggu.



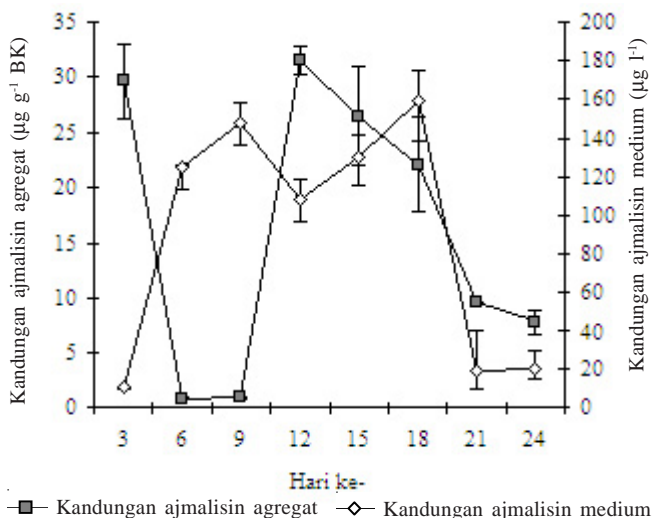
Gambar 4. Kandungan ajmalisin pada agregat sel dan medium berat agregat awal 20 g, aerasi 0.25 l menit⁻¹.



Gambar 7. Kandungan ajmalisin pada agregat sel dan medium, berat agregat awal 30 g, aerasi 0.34 l menit⁻¹.



Gambar 5. Kandungan ajmalisin pada agregat sel dan medium, berat agregat awal 30 g, aerasi 0.25 l menit⁻¹.



Gambar 6. Kandungan ajmalisin pada agregat sel dan medium, berat agregat awal 20 g, aerasi 0.34 l menit⁻¹.

masing 0.25 l menit⁻¹ dan 0.34 l menit⁻¹. Pola produksi ajmalisin diperlihatkan pada Gambar 4, 5, 6, dan 7, dengan kandungan ajmalisin terbanyak pada berat agregat awal 30 g dan laju aerasi 0.34 l menit⁻¹ (Gambar 7). Dari kurva kandungan ajmalisin (Gambar 7) menunjukkan bahwa ajmalisin sudah terdeteksi pada hari ke-3 dan mengalami penurunan pada hari ke-6 dan ke-9. Pada hari ke-12 ajmalisin mencapai jumlah terbanyak di agregat sel dan mengalami penurunan sampai hari ke-24, sedangkan pada medium terbanyak pada hari ke-18 dan selanjutnya mengalami penurunan sampai hari ke-24.

PEMBAHASAN

Induksi Kalus dan Agregat Sel. Kalus yang terbentuk pada medium Zenk (Zenk *et al.* 1977) dengan penambahan 2.50×10^{-6} M NAA dan 10^{-5} M BAP merupakan kalus kompak yang berwarna coklat. Terbentuknya kalus kompak tersebut diduga disebabkan oleh penggunaan NAA sebagai sumber auksin. Hal ini karena NAA tidak menginduksi sintesis enzim selulase dan pektinase yang mempunyai aktivitas lisis terhadap lamela tengah. Akibat tidak terjadinya lisis pada lamela tengah, maka ikatan antara sel menjadi tidak renggang dan memberikan struktur yang kompak serta mempunyai kondisi fisiologis seperti sel dalam kondisi *in vivo* (Zhao *et al.* 2001).

Warna coklat pada kalus diduga karena adanya metabolit sekunder yang diproduksi oleh kalus. Menurut Morris (1986), kalus yang diinduksi pada medium Zenk berwarna coklat dan produksi alkaloidnya tinggi. Perubahan warna juga diduga karena adanya sintesis senyawa fenolik akibat adanya cekaman berupa pelukaan pada jaringan. Pernyataan tersebut diperkuat oleh Verpoorte *et al.* (1993), bahwa terjadinya pencokelatan pada jaringan adalah karena aksi polifenol oksidase dan tirosinase yang disintesis akibat dari oksidasi jaringan ketika terluka, dan senyawa fenolik yang dihasilkan kultur *C. roseus* antara lain asam 2,3 dihidroksibenzoat.

Terbentuknya kultur agregat sel dapat disebabkan oleh pemilihan jenis zpt yang digunakan (Morris 1986; Verpoorte

et al. 1993). Selain itu Fowler (1983) menyatakan tidak terpisahnya sel-sel pada agregat dapat disebabkan oleh adanya sekresi senyawa polisakarida yang melekat pada permukaan sel. Tramper dan Hulst (1992) menyatakan bahwa kultur agregat sel merupakan sel *immobil* secara alamiah. Pada sel *immobil* pertumbuhan selnya rendah tetapi produksi metabolit sekundernya tinggi (Lindsey & Yeoman 1983).

Optimasi Laju Aerasi, Berat Agregat Sel Awal, dan Penentuan Pola Produksi Ajmalisin. Berat agregat sel awal yang digunakan adalah 20 dan 30 g dengan laju aerasi masing-masing 0.25 dan 0.34 l menit⁻¹. Hasil penelitian pada berat agregat sel awal 10 g menunjukkan bahwa sel terangkat dengan sempurna. Akan tetapi, terbentuk busa yang menutupi seluruh permukaan bagian dalam dari bioreaktor lima hari setelah agregat sel dimasukkan ke dalam bioreaktor, yaitu pada laju 0.25 dan 0.34 l menit⁻¹. Pada laju aerasi 0.44 l menit⁻¹ terbentuk busa setelah dua hari. Terbentuknya busa kemungkinan disebabkan oleh laju aerasi yang tinggi, sehingga akan membentuk gelembung udara yang banyak dan menutupi permukaan bioreaktor. Terbentuknya busa juga akan menutupi seluruh permukaan kultur, sehingga menghentikan sirkulasi udara di dalam bioreaktor dan mengakibatkan terjadinya kontaminasi pada kultur (Taticek *et al.* 1991). Zhong (2001) juga menambahkan bahwa terbentuknya busa tersebut selain disebabkan oleh laju aerasi juga disebabkan oleh komposisi medium, viskositas kultur, struktur fisik bioreaktor yang digunakan, dan keberadaan sel-sel tersebut.

Inokulum agregat sel dengan berat awal 40 g, tidak teraduk pada laju aerasi 0.25 dan 0.34 l menit⁻¹. Hal ini disebabkan jumlah agregat sel terlalu banyak, sehingga menyebabkan masalah dalam pengadukan. Akibatnya, sel akan mengendap pada permukaan bawah bioreaktor dan mengalami kekurangan oksigen. Konsentrasi oksigen yang terlarut selama kultur cair memiliki pengaruh kuat dalam aktivitas mitosis dan merupakan penyebab utama dalam rataan tingkat pertumbuhan. Selain itu, apabila sel mengendap akan mengakibatkan kematian karena tidak ada oksigen terlarut. Oksigen diperlukan untuk pertumbuhan sel dan produksi metabolit sekunder (Taticek *et al.* 1991).

Kurva Kandungan Ajmalisin. Ajmalisin pada sel sudah terdeteksi pada hari ke-3 sebagai hasil sintesis pada saat subkultur sebelumnya. Kandungan ajmalisin tersebut menurun pada hari ke-6 hingga ke-9. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh terjadinya degradasi dan polimerasi, baik oleh enzim peroksidase maupun enzim hidrolitik lain yang disintesis selama periode kultur (Croes *et al.* 1995). Menurut Dos-Santos (1994), degradasi ajmalisin terjadi selama fase stasioner periode kultur. Degradasi ini disebabkan oleh proses penghancuran kimiawi dan konversi alami ajmalisin menjadi serpentin atau konversi ajmalisin menjadi stereoisomernya 3,4-dehidro-ajmalisin.

Pada hari ke-12 kandungan ajmalisin dalam sel mencapai optimum (79.23 µg g⁻¹). Peningkatan kandungan ajmalisin terjadi karena ajmalisin disintesis pada fase pertumbuhan (Moreno *et al.* 1995). Pada hari ke-18, kandungan ajmalisin di

dalam medium mengalami peningkatan karena ajmalisin disekresikan ke dalam medium. Peningkatan ajmalisin di medium menurut Neumann *et al.* (1983) dapat disebabkan oleh pH di dalam sel yang lebih tinggi dibandingkan dengan pH di medium. Pada hari ke-15 pH medium berkisar antara 5.4-5.6, sedangkan pada hari ke-18 pH medium berkisar antara 4.6-4.8 (Tabel 1). Menurut Neuman *et al.* (1983), dalam keadaan vakuola lebih asam daripada sitoplasma, alkaloid akan berpenetrasi melalui tonoplas ke dalam vakuola dalam bentuk tidak terprotonasi. Di dalam vakuola yang asam, alkaloid akan terprotonasi sehingga sulit untuk berpenetrasi kembali melalui tonoplas. Alkaloid yang terprotonasi di dalam sitoplasma akan mudah disekresikan ke dalam medium, terutama jika pH medium menjadi lebih rendah daripada pH sitoplasma. Perubahan pH ini dapat diakibatkan oleh adanya hasil metabolime sekunder dan perubahan komposisi medium selama kultur. Sekresi dapat terjadi karena perubahan pH, adanya lisis, dan kematian sel (Neuman *et al.* 1983).

Kandungan ajmalisin yang terbaik adalah pada berat agregat awal 30 g dan laju aerasi 0.34 l menit⁻¹, berturut-turut 79.23 µg g⁻¹ dan 981.15 µg l⁻¹ untuk sel dan medium. Taticek *et al.* (1991) menyatakan bahwa sel-sel tanaman yang dikultur pada laju aerasi yang tinggi (sekitar 0.85 l menit⁻¹) akan menghasilkan konsentrasi CO₂ sekitar 2-4%. Hal ini akan menghambat laju pertumbuhan dan mereduksi biomassa sel. Menurut McHale *et al.* (1987), pertumbuhan kultur sel tumbuhan tidak membutuhkan O₂ yang tinggi, bahkan pada konsentrasi O₂ yang terlalu tinggi dapat menghambat pertumbuhan dan laju pembelahan sel. Namun demikian, oksigen tetap diperlukan untuk pertumbuhan sel dan produksi metabolit sekunder.

Jumlah agregat tinggi, 20-30% (v/v) diperlukan untuk meminimalkan fase lag dan meningkatkan pertumbuhan (Son *et al.* 1999). Kozai (1991) melaporkan bahwa sel tumbuhan tidak akan tumbuh dengan normal pada kerapatan populasi yang terlalu rendah, sel teraduk pada berat agregat sel 10 g tetapi aerodinamis yang terbentuk tidak baik. Kerapatan sel yang tinggi sangat menguntungkan pada kultur yang tumbuh sangat lambat, bahkan berat inokulum maksimum dapat mencapai 60 g l⁻¹. Meskipun demikian, jika sel terlalu rapat akan menyebabkan masalah dalam pengadukan, sehingga sel tidak akan terangkat sempurna dan produksi metabolit sekunder menjadi rendah (Taticek *et al.* 1991).

Tabel 1. Pengukuran pH medium pada saat pemanenan

Hari	Pengukuran pH pada laju aerasi 0.2460 l menit ⁻¹		Pengukuran pH pada laju aerasi 0.3405 l menit ⁻¹	
	Berat agregat sel (g)			
	20	30	20	30
3	5.9	5.9	5.8	5.7
6	5.7	5.7	5.7	5.8
9	5.4	5.4	5.4	5.4
12	5.4	5.4	5.4	5.4
15	5.5	5.6	5.4	5.4
18	4.6	4.7	4.7	4.8
21	5.5	5.5	5.5	5.5
24	5.4	5.4	5.4	5.4

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada Robert Verpoorte dan Maghdi El-Sayed dari *Division of Pharmacognosy, Centre for Biopharmaceutical Sciences, Leiden University, Netherland* yang telah memberikan ajmalisin murni sebagai senyawa pembanding dalam penelitian ini. Ucapan yang sama untuk DITJEN DIKTI melalui Proyek Penelitian Dasar 2003, atas nama Rizkita Rachmi Esyanti.

DAFTAR PUSTAKA

- Asada M, Shuler ML. 1989. Stimulation of ajmalicine production and excretion from *Catharanthus roseus*: effect of adsorption *in situ*, elicitor and alginate immobilization. *Appl Microbiol Biot* 30:475-481.
- Croes AF, Jacobs JJ, Arroo RRJ, Wullems GJ. 1995. Molecular and metabolic control of secondary metabolites. *Plant Cell Org Culture* 43:127-130.
- Dos-Santos IR, Jan S, Verpoorte R. 1994. Ajmalicine Metabolism in *Catharanthus roseus* Cell Culture. *Phytochemistry* 15:677-681.
- Fitriani A, Arbayah HS, Rizkita RE. 1999. Pengaruh pemberian homogenat jamur *Phythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp terhadap kandungan ajmalisin dalam kultur kalus *Catharanthus roseus* (L.) G .Don. *Hayati* 6:65-69.
- Fowler MW. 1983. Commercial application and economic aspect of mass plant culture. Di dalam: Mantell SH, Smith H (ed). *Plant Biotechnology*. London: Cambridge Univ Pr.
- Fulzele DP, Heble MR. 1994. Large scale cultivation of *Catharanthus roseus* cells: production of ajmalicine in a 20 l bioreactor. *J Biotechnol* 35:7-12.
- Kargi F, Rosenberg MZ. 1987. Plant cell bioreactor: present status and future trends. *Biotechnol Progr* 3:1-8.
- Kozai T. 1991. Photoautotrophic micropropagation. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 27:47-51.
- Lindsey K, Yeoman MM. 1983. Novel experiment system for studying the production of secondary metabolites by plant tissue culture. Di dalam: Mantell SH, Smith H. (ed). *Plant Biotechnology*. Cambridge: Cambridge Univ Pr.
- McHale NA, Zeltech J, Peterson RB. 1987. Effects of CO₂ and O₂ on photosynthesis and growth of autotrophic tobacco callus. *Plant Physiol* 84:1055-1061.
- Moreno PRH, van der Heijden R, Verpoorte R. 1995. Cell and tissue culture of *Catharanthus roseus*: a literature survey. *Plant Cell Tiss Org* 42:1-25.
- Morris P. 1986. Regulation of product synthesis in cell culture of *Catharanthus roseus*. III. Alkaloid metabolism in leaf tissue and primary callus. *Planta Med* 121:127-132.
- Neumann D, Krauss G, Hieke M, Groger D. 1983. Indole alkaloid formation and storage in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *Planta Med* 48:20-23.
- Ratnasari J, Arbayah HS, Rizkita RE. 2001. Pengaruh pemberian ekstrak khamir (*Saccharomyces cerevisiae* Hansen) terhadap kandungan ajmalisin dalam kultur agregat sel *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Berita Biologi* 5:4-11.
- Shuler ML, Kargi F. 1992. *Bioprocess Engineering: Basic Concepts*. Englewood Cliffs. New Jersey: Prentice-hall, Inc.
- Sim JS, Chang NH, Liu RJ, Jung HK. 1994. Production and secretion of indol alkaloids in hairy root cultures of *Catharanthus roseus*: effects of *in situ* adsorption, fungal elicitation and permeabilization. *J Ferment Bioeng* 78:229-234.
- Son SH, Choi SM, Kwon SR. 1999. Large-scale culture of plant cell and tissue by bioreactor system. *Plant Biotechnol* 1:1-8.
- Taticek RA, Moo-Young M, Legge RL. 1991. The scale-up of plant cell culture: Engineering considerations. *Plant Cell Tiss Org* 24:139-158.
- Tramper J, Hulst AC. 1992. *Plant Tissue Culture Methods and Application in Agriculture*. New York: Acad Pr.
- Vanisree M *et al*. 2004. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plant by plant tissue cultures. *Bot Bull Acad Sinica* 45:1-22.
- Verpoorte R, van der Heijden R, Memelink J. 2001. Engineering the plant cell factory for secondary metabolite production. *Transgenic Res* 9:323-343.
- Verpoorte R, Van der Heijden R, Schripsema J. 1993. Plant biotechnology for the production of alkaloids; present status and prospect. *J Nat Prod* 56:186-207.
- Zenk MH, El-Shagi H, Stockigt J, Weiler EW, Deus B. 1977. Formation of the indole alkaloids serpentin and ajmalicine in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. Di dalam: Barz W, Reinhard E, Zenk MH (ed). *Plant Tissue Culture and Its Biotechnological Application*. Berlin: Springer-Verlag.
- Zhao J, Hu Q, Guo Y-Q, Zhu W-H. 2001. Effects of stress factors, bioregulators, and synthetic precursors on indole alkaloid production in compact callus clusters cultures of *Catharanthus roseus*. *Appl Microbiol Biot* 55:693-698.
- Zhong JJ. 2001. *Biochemical Engineering of the Production of Plant-Specific Secondary Metabolites by Cell Suspension Cultures*. Advances in Biochemical Engineering. Berlin: Springer-Verlag.